

Aus der Frauenklinik Charlottenburg
der Freien Universität Berlin
Geschäftsführender Direktor: Prof.Dr. H. Lax

Entwicklung eines Radiorezeptorassays für humanes Chorion-
gonadotropin: Anwendung bei normalem und pathologischem
Schwangerschaftsverlauf, Chorionepitheliom und anderen
hCG-produzierenden Tumoren

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung der Medizinischen Doktorwürde
an den Medizinischen Fachbereichen
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Rüdiger Koch
aus Nürnberg

1970

Aus der Frauenklinik Charlottenburg
der Freien Universität Berlin
Geschäftsführender Direktor: Prof.Dr. H. Lax

Entwicklung eines Radiorezeptorassays für humanes Chorion-
gonadotropin: Anwendung bei normalem und pathologischem
Schwangerschaftsverlauf, Chorionepitheliom und anderen
hCG-produzierenden Tumoren

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung der Medizinischen Doktorwürde
an den Medizinischen Fachbereichen
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Rüdiger Koch
aus Nürnberg

Referent: Prof.Dr.med. J. Nevinny-Stickel

Korreferent: Prof.Dr.med. F. Zielske

gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fachbereiche
der Freien Universität Berlin

Promoviert am: 12.1.1978



I n h a l t s v e r z e i c h n i s

	Seite
1.0 Einleitung	1
2.0 Literatur	2
2.1 Humanes Choriongonadotropin hCG	2
2.2 Rezeptoren	3
2.3 Hormon-Rezeptor-Komplex	4
2.4 Nachweismethoden	5
2.5 Anwendung der hCG-Bestimmung in der Gynäkologie	7
2.6 Anwendung der hCG-Bestimmung außerhalb der Gynäkologie	8
3.0 Fragestellung	8
4.0 Material	9
4.1 Rezeptorenpräparation	9
4.2 Hormonpräparate	9
4.3 Seren	10
5.0 Methoden	10
5.1 Radiojodination	10
5.2 Bindungsanalysen	11
5.3 Standardisierung und Spezifität	12
5.4 Radiorezeptorassays (RRA)	13
5.5 Radioimmunoassays	14
6.0 Ergebnisse	14
6.1 Radiojodination	14
6.2 Bindungsanalysen	16
6.2.1 Rezeptorkonzentration und Einsatzvolumen	16
6.2.2 Veränderung der Bindungskapazität	16
6.3 Inhibitionskurven	18
6.3.1 Standards im Puffersystem	18
6.3.2 Kreuzreaktionen	18
6.3.3 Serumeinfluß	19

6.4	Anwendung des Radiorezeptorassays	20
6.5	Klinische Untersuchungen	21
7.0	Diskussion	24
8.0	Zusammenfassung	28
9.0	Abbildungen	30
10.0	Literaturverzeichnis	46
11.0	Danksagung	54
12.0	Lebenslauf	55

1.0 Einleitung

Der Nachweis des humanen Schwangerschaftshormons Choriongonadotropin (hCG) in den verschiedenen Körperflüssigkeiten bei Frühschwangerschaften, bei Verdacht auf nicht intakte bzw. ektopische Graviditäten, bei Chorionepitheliomen und anderen hCG-produzierenden Tumoren erleichtert die Diagnostik sowie Therapiekontrolle. Die Entwicklung sogenannter Radiorezeptorassays (RRA) für Proteohormone (seit 1970), hat diese Art des in vitro Bioassays als nützlich und vielseitig anwendbar erwiesen. Aus der Benennung RRA geht hervor, daß hier eine Kombination von Nuklearmedizin, Biochemie und von biologischen Meßmethoden vorliegt. Damit bietet es sich an, eine Methodik zur Bestimmung von biologisch aktivem Schwangerschaftshormon zu entwickeln. Nachweisverfahren biologischer Art, sowie immunologische und radioimmunologische Methoden zur hCG-Bestimmung präexistierten, sind jedoch entweder in ihrer Aussagekraft oder Praktikabilität für den klinischen Gebrauch nicht in jedem Fall verwendbar.

Um solche vom angewandten Material abhängigen Einschränkungen weitgehendst auszuräumen, wurde ein Radiorezeptorassay für hCG entwickelt, der sich die Interaktion des tropen Hormons mit einem Rezeptor zunutze macht und den quantitativen Nachweis biologisch aktiven Hormons gestattet, verbunden mit hoher Sensitivität. Die einfach zu etablierende Methodik ist darüber hinaus mit ihren schnell faßbaren und exakten Ergebnissen für klinische Fragestellungen in Hinsicht auf die einzuleitende Therapie von Bedeutung.

2.0 Literatur

2.1 Humanes Choriongonadotropin hCG

Aschheim und Zondek (2) entdeckten 1927 im Urin schwangerer Frauen eine Substanz mit gonadotroper Aktivität. Sie wurde später als humanes Choriongonadotropin hCG identifiziert. Die Produktions- bzw. Speicherstätte für hCG in der Plazenta wird von Knoth et al (26) und von Loke et al (33) in den Zytotrophoblastzellen lokalisiert. Diese Untersuchungen stehen mit der Überlegung in Einklang, daß hCG als Polypeptid in proteinsynthetisierenden Zellen mit hohem Gehalt an Ribonukleinsäure (RNS), die bekanntlich als Matrize dient, nachgewiesen werden könnte (53). Durch Isolierung und Reinigung von hCG gelang die Aufklärung der Primär-, Sekundär-, Tertiär- und Quartärstruktur des Moleküls (3, 4, 5, 7). Chemisch ist das hCG ein Glykoproteohormon, dessen hoher Polysaccharidanteil (30 %) kovalent an die Peptidketten der Protomeren gebunden ist (4). Sein Molekulargewicht wird von Canfield et al (7) mit 46.000 angegeben. Die biologische Halbwertszeit des hCG's beträgt nach Geiger 9 Stunden in der Initialphase und 22 Stunden in den weiteren Phasen (22). In einem geeigneten Milieu kann hCG in zwei nicht identische Anteile zerlegt werden (7, 36, 48). Diese Untereinheiten werden als α - und β -Subunits bezeichnet. Sie haben unterschiedliches Molekulargewicht und sind nicht kovalent miteinander verbunden (7). Die α -Untereinheiten anderer Glykoproteohormone wie die des follikelstimulierenden Hormons (FSH), des luteinisierenden Hormons (LH) und des thyreoideastimulierenden Hormons (TSH) sind in ihrer Aminosäuresequenz mit der α -Kette von hCG nahezu identisch (43). Sie ist der weniger charakteristische Molekülbestandteil und innerhalb der Gruppe der Glykoproteohormone einer Spezies austauschbar, d.h. das rekombinierte Hormon aus der β -Subunit und ausgewechselter α -Subunit besitzt die

gleiche biologische Aktivität wie das ursprüngliche Hormon (41). Die β -Untereinheiten weisen zwar gemeinsame Merkmale auf, unterscheiden sich aber stärker in der Aminosäuresequenz, besonders im carboxyterminalen Strukturbereich, der für jedes Hormon spezifisch zu sein scheint (37). Daher gilt die β -Untereinheit als der für die Hormonwirkung spezifische Anteil, der mit dem Rezeptor reagiert (5).

2.2 Rezeptoren

Die Aktivität der Gonadotropine auf Organniveau ist schon seit beträchtlicher Zeit bekannt und bildet die Grundlage der meisten biologischen Meßmethoden. Die Lokalisation der Glykoproteohormone auf zellulärer Ebene wird mit der Theorie zellmembrangebundener Rezeptoren als Bindungsstellen für die tropen Hormone erklärt. Hochgradige Selektivität und Strukturgebundenheit kennzeichnen diese Rezeptoren. Durch morphologische Studien wurden gonadale Membranrezeptoren für LH und hCG demonstriert. Der Einsatz markierter Hormone zeigte ihre Bindungsstellen an den Zielzellen bzw. Geweben (8, 17). Die quantitativ hohe Rezeptorenpopulation dieser Gewebe, und damit die relevanten Objekte der tropen Hormone, wurde durch Studien von Catt et al (9) nachgewiesen. Ebenso zeigten Leidenberger et al (30) die in vitro Aufnahme jodinierten Choriongonadotropins von Rattenhodenhomogenaten und Interstitialzellen. Ihre Ergebnisse wie die der vorgenannten Untersuchungsgruppe stellten eindeutig heraus, daß testes in erheblich höherem Grade markiertes hCG binden, als beispielsweise Nieren-, Leber- oder Muskelgewebe. Rezeptoren besitzen demnach 3 Charakteristika: a) Strukturgebundene Kumulation in Zielgeweben bzw. an Zielzellen, b) Strukturmerkmale, die auf das emittierte Hormon reagieren und c) Spezifität, die aus den Strukturmerkmalen resultiert. Die Molekularstruktur des Rezeptors und seine reaktiven Gruppen sind noch nicht aufgeklärt und zur Zeit Ziel intensiver Forschungsbemühungen.

2.3 Hormon-Rezeptor-Komplex

Der erste notwendige Schritt zur lokalen Aktivitätsentfaltung des hCG's ist, daß es irgendwo am Zielorgan erkannt wird und sich an dessen differenzierungsfähigen Rezeptor binden kann. Das Hormon besitzt eine spezifische Affinität zu diesem Rezeptor. Solche Erkennungsstellen für affine Substanzen sind als aktive Zentren mit strukturellen und biochemischen Eigenschaften auf molekularer Ebene aufzufassen, deren quasi "negativer Abdruck" die affine Substanz ist. Eine Anlagerung an diese aktiven Zentren führt über lokale physikochemische Änderung der lokalen biologischen Eigenschaft am Reaktionsort zu einem Reiz, welcher schließlich den Effekt auslöst. Zwei dieser Effekte, ausgelöst durch die Bindung nativen Hormons an Plasmamembranrezeptoren eines testikulären Homogenats, sind von Catt et al beschrieben worden: 1) Testosteronproduktion und 2) cAMP-Produktion proportional zum gebundenen J^{125} -hCG (10). Nach enzymatischem Abbau terminaler Kohlenhydratreste läßt die biologische *in vitro* Aktivität von hCG, gemessen durch die Testosteronproduktionsrate, signifikant nach. Sie liegt aber noch weit über den Werten, die durch konventionelle Bioassays *in vivo* gewonnen werden können. Die Affinität zum Rezeptor bleibt von dieser Manipulation unbeeinflusst (10). Diese Tatsache läßt den Schluß zu, daß die enzymatisch entfernten Kohlenhydratreste des hCG's nicht essentiell sind für die spezifische Hormonbindung an die Membranrezeptoren. Im Metabolismus der Glykoproteohormone scheinen sie jedoch von Bedeutung zu sein, denn ihre Entfernung ist von einer Zunahme der Plasmaclearance und einer gesteigerten Aufnahme der so modifizierten Hormone in die Leber begleitet (50). Hier sind möglicherweise zwei Hauptinaktivierungsschritte für natives hCG angedeutet. Den isolierten Untereinheiten des hCG fehlt die biologische in vivo und in vitro Aktivität, was zu beweisen scheint, daß die spezifischen Merkmale

der β -Untereinheit nur in der Quartärstruktur des Glykoproteohormons durch Assoziation der α - und β -Subunit zur Geltung gelangen (11).

Die physiologische Bedeutung des hCG wird aus der Wirkungsäquivalenz mit dem tropen humanen Hypophysenhormon hLH abgeleitet. Beide stimulieren die Steroidogenese im Ovar und in der Plazenta (51). Sie fördern beide die Entwicklung und Erhaltung des corpus luteum menstruationis bzw. graviditatis (16, 20, 22). Außerdem wird noch ein Einfluß des hCG auf die Funktion des fetalen Hodens und damit auf die Differenzierung des fetalen Genitaltraktes angenommen, sowie ein Eingreifen in die mütterlichen Immunoreaktionen bei der Implantation des Trophoblasten im Endometrium (1, 19, 39).

2.4 Nachweismethoden

Der Nachweis von hCG sowie die Überwachung seines Konzentrationsverlaufes während normaler und pathologischer Graviditäten ist seit der Entdeckung der gonadotropen Substanz im Urin Schwangerer durch 4 Testverfahren ermöglicht worden:

- 1) Biologische Verfahren
- 2) Immunologische Verfahren
- 3) Radioimmunologische Verfahren
- 4) Radiorezeptorassays

ad 1

Biologische Schwangerschaftsteste wie die Aschheim-Zondek-Reaktion nutzen die physiologische Antwort der Gonaden infantiler weiblicher Mäuse auf Gaben von hCG aus (2). Injektion von Schwangerenharn löst eine überstürzte Reifung der Mäuseovarien mit Auftreten hämorrhagischer Follikel und der Entwicklung von corpora lutea aus. Dieser Test wurde

durch schnellere Prozeduren ersetzt, z.B. den Krötentest nach Galli-Mainini (35). Männliche Erdkröten oder Frösche scheiden 3 Stunden nach Injektion hCG enthaltender Proben mit ihrem Urin Spermatozoen aus.

ad 2)

hCG vermag im Hämagglutinationshemmtest nach Wide und Gemzell die Agglutination zwischen schon mit hCG beladenen Schafererythrozyten und Anti-hCG-Serum vom Kaninchen zu verhindern (54). Weiterentwicklungen der immunologischen Methoden sind der Pregnosticon-Test, Prepuerin-Test, Gravindex-Test, Gonavislide-Test, sowie eine von Brody et al entwickelte Komplementbindungsreaktion (6).

ad 3)

Radioimmunologische Nachweismethoden basieren auf dem Prinzip einer Konkurrenzreaktion des markierten Hormons (1. Antigen) mit dem nicht markierten und zu bestimmenden Hormon (2. Antigen) um eine spezifische Antikörperbindungsstelle. Die Reaktion folgt dem Massenwirkungsgesetz. Ein Radioimmunoassay (RIA) wird stets so durchgeführt, daß eine konstante Menge Antiserum und eine konstante Menge radioaktiv markierten 1. Antigens (*hCG) mit einer variablen Menge des zu messenden 2. Antigens (nicht markiertes hCG) zur Reaktion gebracht wird. Nach weiteren Verfahrensschritten wird der dann präzipitierte Antigen-Antikörperkomplex in einem Gammacounter gezählt. Durch Vergleich mit Standardkurven ermittelt man die Antigenmenge unbekannter Proben. Diese Technik des Radioimmunoassays, einer Verbindung von Nuklearmedizin und Immunologie, wurde zuerst von Yalow und Berson (56) vorgestellt. Ausführliche Analysen über die Methodik des RIA finden sich in einem Buch von Kirkham und Hunter (25).

ad 4)

Im Unterschied zu den radioimmunologischen Methoden der Hormonbestimmung aus Körperflüssigkeiten werden bei Radiorezeptorassays Zellmembranen als Rezeptoren anstelle von Antisera eingesetzt. Diese Zellmembranen sind von unterschiedlicher Provenienz. Catt et al (12) verwendeten Interstitialzellen von Rattentestes. In einer weiteren Untersuchung wiesen sie die hohe Bindungsrate rezeptor-dissoziierten hCG's nach (10). Die Bindungsaktivität der Granulosazellen von Follikeln verschiedener Reifegrade verglichen Channing und Kammerman (15). Von Leidenberger und Reichert (30, 31) stammt die Beschreibung der Herstellung eines einfacheren, nicht fraktionierten Rattenhodenhomogenats, mit dem sie einen Assay für LH entwickelten (42). Plasmamembranen von Rattenlutealzellen untersuchten Rao und Saxena (40) auf Rezeptorbindungsstellen. Lee und Ryan berichteten 1975 (29) über einen Rezeptorassay für hCG mit fraktionierten Ovarialhomogenaten von Ratten. Die Anwendung eines Rezeptorassays zur Diagnostik gestörter Schwangerschaften zeigen Saxena und Landesman (28, 45). Sie präparierten den Rezeptor aus bovinen corpora lutea. Humane Ovarialrezeptoren waren der Gegenstand der Untersuchungen von Wardlaw et al (52).

2.5 Anwendung der hCG-Bestimmung in der Gynäkologie

Am wichtigsten ist die hCG-Bestimmung zum Nachweis oder Ausschluß einer Schwangerschaft. Hierzu kann man sich qualitativer sowie quantitativer Tests bedienen, deren Zuverlässigkeit und Validität von ihrer Spezifität und Empfindlichkeit abhängen. Jedoch nicht nur die Existenz bzw. Nichtexistenz einer Gravidität ist von Interesse, sondern auch eine Aussagemöglichkeit über die Art und den Verlauf der Schwangerschaft. Normotope und ektope

Graviditäten lassen sich durch hochempfindliche Testverfahren voneinander unterscheiden. Ein Abortgeschehen ist durch hCG-Verlaufskontrollen wahrscheinlich zu machen. Plazentaentartungen, wie Blasenmolen, Chorionepitheliosen bzw. Chorionepitheliome sind an unphysiologisch hohen hCG-Serum- und Urinwerten zu erkennen und die Therapie solcher Erkrankungen kann mittels hCG-Test kontrolliert werden. Der hCG-Nachweis ohne Vorhandensein einer Schwangerschaft kann zur Diagnose eines Disgerminoms oder Ovarialteratoms führen (55).

2.6 Anwendung der hCG-Bestimmung außerhalb der Gynäkologie

In den Mischgeschwülsten des Hodens kann außer unreifem Epithel und Bindegewebe auch sonst nur im weiblichen Organismus vorkommendes Chorionepithel auftauchen. Dieser Tumor ist endokrin wirksam und ist durch hCG-Nachweis diagnostizierbar.

3.0 Fragestellung

Der Aufbau eines RRA für hCG und der routinemäßige Einsatz dieser Labormethode ist nur sinnvoll, wenn hierdurch eine Verbesserung in der Diagnostik zu erzielen ist. Die Vorteile der biologischen, immunologischen und radioimmunologischen Testverfahren zu bewahren und ihre Nachteile auszuklammern, sind die Anforderungen, die an solch ein Assaysystem gestellt werden. Es wird geprüft, ob es mit einem RRA gelingt, die Kriterien Spezifität, Empfindlichkeit, schnelle Durchführbarkeit und geringer Aufwand in einer Methode zu kombinieren. Weiterhin ist es Zweck dieser Untersuchung, die Anwendung dieses in vitro Bioassays für klinische Fragestellungen zu zeigen und Interpretationsmöglichkeiten der gefundenen quantitativen Ergebnisse zu bewerten, hinsichtlich tatsächlicher biologischer Aktivität des produzierten hCG's und der Beziehung zwischen Symptomatik und gemessenem hCG-Spiegel.

4.0 Material

4.1 Rezeptorenpräparation

Die Rezeptoren werden nach der Methode von Leidenberger und Reichert (30, 31) aus Rattenhoden präpariert. Sechzig bis achtzig Tage alte Ratten (130 - 240 g schwer) vom Stamm Wistar wurden ausgewählt, da deren testes nach Pahnke et al (38) bis zu diesem Alter eine Zunahme der hCG-Bindungs-kapazität zeigen. Nach Entnahme der testes werden diese gewogen und von der tunica albuginea befreit. Ihr Gewicht wird vom Hodengewicht abgezogen und so das Ausgangsmaterial in Gramm erhalten. Es folgen im Eisbad Zerkleinerung, Homogenisation per Hand durch 15 Schübe und Filtration des Homogenats durch eine 3-fache Lage Verbandmull. Das gesamte Gewebe wurde mit Tris-HCl Puffer gespült (0,1 M Tris-HCl, 5 mM $MgCl_2$ und 0,1 M Saccharose, pH 7,3), so daß eine definierte Endverdünnung von 1:2 (d.h. 1 Gramm Gewebe plus 1 ml Puffer) vorliegt. Diese Filtration erfolgt, um tubuli und größere Gewebetrümmer zurückzuhalten. Das endgültige Filtrat, das aus Zellen und Zellbruchstücken sowie aus Zellinhalten besteht, enthält auch die hCG-bindungsfähigen Plasmamembranen und wird bei $-40^{\circ}C$ in Aliquots von 1 ml eingefroren und bis zum Gebrauch für einen RRA gelagert (14). Es konnte über mehrere Monate ohne größere Abnahme der Bindungskapazität für hCG aufbewahrt werden. Die Aufarbeitung der Rezeptoren ist in Abbildung 1 dargestellt.

4.2 Hormonpräparate

Ein hochgereinigtes hCG-Präparat von Dr. van Hell, Organon, Leyden/Holland, dessen biologische Aktivität mit 14 000 I.E. pro mg Protein angegeben ist, wurde mit Jod^{125} markiert (18). Darüber hinaus wurde es ebenfalls als Standard benutzt. Um die zu erwartenden Ergebnisse international vergleichbar gestalten zu können, wurde das "Zweite Internationale Referenzpräparat für hCG" (2. IRP-hCG) der WHO als Vergleichsgröße gewählt. Kreuzreaktionen des Assaysystems mit den

gonadotropen Glykoproteohormonen FSH und LH wurden mit dem FSH-Präparat LER-1801-3 und dem LH-Präparat LER-960 ausgetestet. Diese Substanzen wurden freundlicherweise vom NIAMDD, Bethesda, Maryland, U.S.A., zur Verfügung gestellt. Kommerziell erhältliches hCG (Primogonyl^(R)) diente dazu, die unspezifische Bindung in jedem Assay zu bestimmen.

4.3 Seren

Serum von Schwangeren der 1. bis 40. Schwangerschaftswoche, von Patienten mit pathologischen bzw. ektopen Schwangerschaften, Chorionepitheliomen, Blasenmolen und anderen hCG-produzierenden Tumoren bildete das Untersuchungsmaterial. Es stammte aus dem Krankengut der Universitätsfrauenklinik Charlottenburg. Bei zu erwartenden hohen hCG-Serumkonzentrationen wurde das Serum vorher entsprechend verdünnt.

Das Blut wurde unmittelbar nach Entnahme bei 2000 rpm 10 Minuten zentrifugiert und das von den korpuskulären Bestandteilen getrennte Serum bei -40°C bis zur Untersuchung aufbewahrt.

5.0 Methoden

5.1 Radiojodination

Die Markierung des hCG's mit Jod¹²⁵ (Amersham, England) wurde modifiziert nach der Methode von Greenwood und Hunter (23) mit Chloramin-T (CAT) durchgeführt.

Die Reaktionssubstanzen wurden auf eine Jodinationsspritze in folgender Reihenfolge aufgezogen: 10 µl hCG-Lösung (5 µg hCG in 0,5 M Phosphatpuffer, pH = 7,3), 30 µl 0,5 M Phosphatpuffer, 10 µl Jod¹²⁵-Lösung (1 mCi), 10 µl CAT (10 µg CAT, gelöst in 0,05 M Phosphatpuffer); nach 20 Sekunden

den und gutem Mischen der Substanzen wurde die Reaktion durch Zugabe von 20 μ l Natriumbisulfit (40 μ g $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$, gelöst in 0,05 M Phosphatpuffer) gestoppt.

Die Trennung von freiem und an das hCG gebundenem radioaktivem Jod erfolgte durch Gelfiltration. Hierzu wurde das Reaktionsgemisch (80 μ l) auf eine mit 10 % Humanserumalbumin-Lösung abgesättigte Sephadex-G-100 Säule (30 cm) übertragen. Die Elution erfolgte mit 0,05 M Phosphatpuffer (pH = 7,3). Zwanzig Fraktionen von je 0,5 ml wurden gesammelt und 10 μ l einer jeden Fraktion in einem automatischen Gamma-counter gemessen. Die radioaktiv markierten Hormonfraktionen wurden in Aliquots bei -40°C eingefroren und innerhalb von zwei Wochen verbraucht. Die spezifische Aktivität des Tracers wurde durch Präzipitation mit Trichloressigsäure bestimmt.

5.2 Bindungsanalysen

Aufgetaute Rezeptorenpräparate wurden in verschiedenen Graden mit Tris-HCl-Puffer verdünnt und einer Analyse ihrer Bindungskapazität unterzogen, um eine optimale, im Assay verwendbare Verdünnungsstufe zu ermitteln. Hierzu wurden Tracer und Rezeptor zusammen inkubiert. Diejenige Verdünnungsstufe wurde als optimal angesehen, die bei konstanter vorgegebener Totalaktivität, auf die der Tracer durch Verdünnung mit Tris-HCl-Puffer eingestellt war, eine Bindungsrate von $15\% \pm 5\%$ aufwies, ausgedrückt in Prozenten der Totalaktivität. Gleichzeitig hiermit wurde durch unterschiedliche Einsatzvolumina der Rezeptorenlösung das günstigste Volumen festgestellt.

Um eine Aussage treffen zu können über die Veränderung der Bindungskapazität definierter Rezeptorenverdünnungen von konstantem Einsatzvolumen bei unterschiedlicher Total-

aktivität, wurde der Tracer von einer eingestellten Totalaktivität aus reihenverdünnt und mit den Rezeptoren zur Reaktion gebracht.

Eine weitere Bindungsstudie sollte das Rezeptorenverhalten hinsichtlich seiner Hormonbindungskapazität in Abhängigkeit von der Inkubationszeit und der Temperatur, der das Inkubationsgemisch ausgesetzt war, ermitteln. Die rezeptorgebundene Radioaktivität wurde bei 37°C, 25°C und 4°C über einen Zeitraum von 36 Stunden gemessen.

5.3 Standardisierung und Spezifität

Die für den Radiorezeptorassay geeigneten Totalaktivitäten und Rezeptorkonzentrationen sowie Volumina wurden durch Bindungsstudien festgestellt. Die Sensitivität des Rezeptors wurde mittels Inhibitionskurven geprüft. Zu dem Reaktionsansatz aus Rezeptor und hCG-Tracer bestehend, wurden abfallende Konzentrationen von nativem hCG (van Hell-hCG oder 2. IRP-hCG) hinzugegeben. Diese Versuchsanordnung stellte den Arbeitsbereich des verwendeten Assaysystems fest. Zur Untersuchung kreuzreagierender Hormone wie LH und FSH wurde wie oben verfahren, mit dem einzigen Unterschied, daß anstelle von nativem hCG LH (LER-960) oder FSH (LER-1801-3) eingesetzt wurde. Diese Standardkurven wurden in einem 1 % HSA-Puffer und hLH- und hFSH-freiem Serum erstellt.

Zur Demonstration der Abhängigkeit des Assays von hCG-Serumkonzentrationen und zur Ausschaltung unspezifischer Serumeffekte wurden Inhibitionskurven von nativem Standard-hCG und Schwangerenserum mit bekanntem hCG-Gehalt verglichen. Beide Ansätze erfolgten zu diesem Zweck in Serumproben eines hypophysektomierten Patienten. Der Einfluß geringer Konzentrationen kreuzreagierenden hLH's, dessen Serumspiegel prä- wie postovulatorisch im Bereich von 10 - 20mIU/ml liegt, auf den Arbeitsbereich des hCG-Assaysystems wurde mit gepooltem Serum nicht schwangerer Frauen in der frühen Follikelphase ausgetestet (44, 49).

Nach Reichert et al. (42) nimmt die Sensitivität des RRA zu, wenn Standards und unbekannte Serumproben vorinkubiert werden. Daher wurden alle Versuchsansätze 30 Minuten vorinkubiert. Dies gilt besonders für den b_0 -Wert, der die Bindungskapazität des Rezeptors für hCG angibt. Er bestimmt wieviel prozentual von der Totalaktivität gebunden wird, wenn keine Konkurrenzreaktion (Inhibition) stattfindet. Daher muß der b_0 -Wert den gleichen Bedingungen unterworfen werden wie die Standards und unbekannten Proben.

Die unspezifische Bindung (b_N), d.h. nicht rezeptorgebunden, markiertes Hormon bei 1000-fachem Überangebot von nichtmarkiertem hCG, wurde mit dem Präparat Primogonyl^(R) ermittelt.

5.4 Radiorezeptorassays (RRA)

Die Versuchsdurchführung des RRA erfolgte ähnlich der von Reichert et al (42) angegebenen Methodik. 100 μ l Originalserum oder entsprechend verdünntes Serum, 100 μ l 1 % HSA-Tris-HCl-Puffer (pH = 7,3) und 0,2 ml bzw. 1,0 ml der Rezeptorverdünnung wurden in Zentrifugenröhrchen pipettiert, auf einem Vortexmischer gemischt und anschließend 30 Minuten bei 37° C vorinkubiert. Hierauf folgte die Zugabe von 100 μ l Tracer einer entsprechenden Totalaktivität und erneutes Mischen. Es schloß sich daran eine weitere Inkubationszeit von 2 Stunden bei 37° C an. Der Reaktionsansatz wurde zur Trennung des Hormon-Rezeptor-Komplexes vom ungebundenen Jod¹²⁵-hCG bei 5000 x g und einer Temperatur von 1° C 15 Minuten zentrifugiert, der Überstand abgesaugt, das Sediment mit 1 ml eiskaltem Tris-HCl-Puffer gewaschen und wiederum bei 5000 x g zentrifugiert. Nach Absaugen des Überstandes wurden die Impulse pro Minute (cpm) des Sedimentes im automatischen Gammacounter gezählt. Abbildung 2 gibt das Pipettierschema für den RRA wieder.

5.5 Radioimmunoassays

Vergleichende Untersuchungen wurden mit einem Radioimmunoassay (RIA) für hCG angestellt. Nach der Doppelantikörper-solid-phase-Methode (DASP) wurde der Reaktionsansatz (Abbildung 3) nach 24 Stunden Inkubationszeit bei Raumtemperatur mit "DASP-anti-rabbit" weitere 3 Stunden inkubiert und anschließend 10 Minuten bei $8500 \times g$ der Antigen-Doppelantikörperkomplex getrennt. Die Messung des radioaktiven Sediments, nach Absaugen des Überstandes, erfolgte wie beim RRA.

Die Probenbestimmungen fanden stets in Duplikaten statt. Die Pipettierschritte wurden im Eisbad ausgeführt, gleiche Versuchsbedingungen und einheitliche Reaktionsvolumina eingehalten. Bei der Auswertung der Ergebnisse bediente ich mich eines Computerprogramms. Die Bindungsraten des Rezeptors sind in Prozenten der entsprechenden Totalaktivität oder Bindungskapazität unter Berücksichtigung der unspezifischen Bindung und der Leerimpulsrate (background) des Gammacounters angegeben, dessen Detektorempfindlichkeit 69 % beträgt.

6.0 Ergebnisse

6.1 Radiojodination

Die Trennung des freien radioaktiven Jods von markiertem Jod¹²⁵-hCG gelingt durch Gelchromatographie. Ihr Prinzip beruht auf einer Trennung niedermolekularer von höhermolekularen Substanzen durch Angebot von Lösungsraum, welchen sie unterschiedlich beanspruchen (27). Im Eluat erscheint somit das jodmarkierte hCG vor dem freien radioaktiven Jod.

Die Impulsrate der Radioaktivität (cpm) von 10 μ l einer jeden der 20 gesammelten Fraktionen ist in Abbildung 4 in Abhängigkeit von der Fraktion dargestellt. Das Elutions-

profil zeigt deutlich einen ersten steilen Anstieg von Fraktion 5 zu 6, der sprunghaft bis zur 8. Fraktion zunimmt (166.285 cpm). Die Radioaktivität nimmt dann allmählich über die Fraktionen 9 und 10 bis zur 11. auf 25.000 cpm ab, hat bis zur 14. Fraktion eine Plateauphase und steigt in der 16. Fraktion bis zu Werten über eine Million Impulsen pro Minute an. Erst in der 19. Fraktion nimmt die Radioaktivität ab, was durch die steil nach unten verlaufende Kurve zu sehen ist. Das Diagramm weist 2 Gipfel auf und nach den theoretischen Überlegungen ist das Jod¹²⁵-markierte hCG in den Fraktionen zu finden, die den 1. Gipfel des Elutionsprofils verursachen. Zur Identifikation des Jod¹²⁵-hCG wurde von jeder Fraktion eine Kontrolle auf Rezeptoraffinität durchgeführt.

Abbildung 4 zeigt unter dem Elutionsprofil das Bindungsprofil der einzelnen Fraktionen. Die Angaben der prozentualen Bindung beziehen sich auf eine Totalaktivität von 20.000 cpm, die bei allen, außer den ersten vier Fraktionen durch entsprechendes Verdünnen hergestellt wurde. Eine hohe Rezeptorenaffinität findet sich nur in den Fraktionen 7, 8, 9 und 10, die das radioaktiv markierte hCG enthielten. An Hand des Elutionsprofils wurde nach jeder Markierung das Jod¹²⁵-hCG identifiziert, eingefroren und gelagert oder sofort weiterverwendet.

Nach abgeschlossener Markierung wurde die spezifische Aktivität des Tracers durch 10 % Trichloressigsäurepräzipitation aus einem Bruchteil (1/8) des Reaktionsansatzes bestimmt.

Bei einer präzipitierten Proteinmenge von $625 \cdot 10^{-6} \mu\text{g}$ und einer eingesetzten Radioaktivität von $125 \cdot 10^{-6} \text{ mCi}$ errechnete sich durchschnittlich eine Aktivität des präzipitierten Tracers von $6-13 \cdot 10^{-6} \text{ mCi}$, dessen spezifische

Aktivität 15 ± 5 $\mu\text{Ci}/\mu\text{g}$ Protein betrug.

6.2 Bindungsanalysen

6.2.1 Rezeptorkonzentration und Einsatzvolumen

1/10, 1/50, 1/100 Rezeptorenverdünnungen mit einem Einsatzvolumen von 100, 200, 500 und 1000 μl wurden mit hCG-Tracer einer konstanten Totalaktivität (27.000 cpm) inkubiert, und nach der beschriebenen Prozedur der Hormon-Rezeptor-Komplex getrennt. Aus Abbildung 5 (linke Bildhälfte) ist ersichtlich, daß die 1/10 Verdünnung eine ausreichend hohe Bindungskapazität (17 %) bei einem Einsatzvolumen von 200 μl Rezeptorlösung aufweist. Die Bindungsraten der beiden anderen Verdünnungsstufen erreichen selbst bei Vervielfachung des Volumens nicht die Zehnprozentmarke. Für die hCG-Bestimmung mittels RRA wurden daher 200 μl der 1/10 Rezeptorverdünnung pro Inkubationsröhrchen verwandt, deren durchschnittliche Bindungskapazität über 15 % der vorgegebenen Totalaktivität lag.

Eine gleichartige Untersuchung bei veränderter aber konstant gehaltener Totalaktivität (100.000 cpm) ergab ein optimales Einsatzvolumen von 1 ml einer 1/30 Rezeptorenverdünnung mit einer Bindungskapazität über 15 %. Auch diese Kombination von Totalaktivität des Tracer-Hormons und Rezeptorlösung wurde im RRA angewandt.

6.2.2 Veränderung der Bindungskapazität

Eine Ausgangstotalaktivität des Tracers (30.000 cpm) als 0. Verdünnung bezeichnet, wurde in 3 Stufen 1:2 reihenverdünnt. Jede dieser Verdünnungen reagierte 150 Minuten mit einem konstanten Volumen (200 μl) der 1/10 Rezeptorlösung. Anschließend wurde der Hormon-

Rezeptor-Komplex wie üblich abzentrifugiert und gemessen. Die graphische Darstellung des Ergebnisses dieser Untersuchung zeigt Abbildung 5 (rechte Bildhälfte). Hier ist die Totalaktivität in Abhängigkeit von ihren einzelnen Verdünnungen auf der linksseitigen Ordinate, die Bindungskapazitäten mit den jeweiligen Totalaktivitäten auf der rechtsseitigen Ordinate aufgetragen. Im Bereich der Totalaktivitätskurve, von 30.000 cpm auf 10.000 cpm abfallend, nimmt die Rezeptorbindungskapazität für das Jod¹²⁵-hCG von 17 % auf 24 % zu, ein weiteres Absinken der Totalaktivität führt zu keiner Veränderung des Bindungsverhaltens. Der Schnittpunkt beider Kurven liegt bei 20.000 cpm der Totalaktivität und 20 % Bindung.

Unter den gleichen Versuchsbedingungen wurde 1 ml einer 1/30 Rezeptorenverdünnung getestet. Die Ausgangstotalaktivität betrug hier 300.000 cpm. Der Kurvenschnittpunkt lag bei 90.000 cpm und 22 % Bindung.

Die Abhängigkeit der Assoziation des markierten hCG's mit dem testiculären Rezeptor von der Temperatur und der Zeit beschrieben Catt et al.(10). Eigene Untersuchungen bestätigen weitgehend diese Ergebnisse. Innerhalb der ersten 2 Stunden 30 Minuten Inkubationszeit bei 37° C Temperatur nahm die Bindungskapazität rapide bis zu 33 % zu. Die Verlängerung der Inkubationszeit über 6 Stunden (bis zu 27 Stunden) führte zu einem kontinuierlichen Abfall der sedimentierbaren, rezeptor-gebundenen Radioaktivität (unter 10 %). Die Bindungskurve bei 25° C Raumtemperatur stieg etwas weniger steil an, erreichte nach 6 Stunden Inkubation ein Maximum von 36 % Bindung und fiel nach der 15. Inkubationsstunde parallel zur ersterwähnten Kurve (37° C) ab.

Nach 36 Stunden betrug die Bindungskapazität noch 15 %. Ganz anders verhielt sich der Verlauf der Bindungskurve bei 4° C (Kühlraumtemperatur). Eine initial, innerhalb von 2 Stunden und 30 Minuten zunehmende Bindung wurde von einer flacher verlaufenden, kontinuierlichen (bis zur 36. Inkubationsstunde) Kapazitätzunahme gefolgt. Nach Beendigung des Versuches hatte der Rezeptor eine Bindungskapazität von 32 % erreicht. Der Unterschied dieser Ergebnisse zu den von Catt et al gefundenen liegt in der steileren Zu- und Abnahme der Bindungskapazität, sowie im Zeitpunkt, zu dem die Kurven (37° C, 25° C) abfallen. Abbildung 6 stellt diese Ergebnisse graphisch dar.

6.3 Inhibitionskurven

6.3.1 Standards im Puffersystem

Mittels kompetitiver Bindungshemmung von Jod¹²⁵-hCG durch zunehmende Konzentrationen nicht markierten hCG's wurde die Sensitivität des Rezeptors geprüft. 2. IRP-hCG (2 mIU bis 265 mIU/100 µl) und van Hell hCG (0,3 ng bis 50 ng/100 µl) wurden als kompetitive Bindungspartner eingesetzt. Abbildung 7 zeigt 1.) bei zunehmender Konzentration, sowohl des 2. IRP-hCG's als auch des van Hell-hCG's, eine stetige, gradlinige Abnahme des gebundenen radioaktiven Hormons, und 2.) Parallelität zwischen beiden als Standard benutzten hCG-Präparaten. Aus dieser Parallelität errechnete sich ein Konversionsfaktor von 1 ng van Hell-hCG zu 14 mIU 2. IRP-hCG.

6.3.2 Kreuzreaktionen

Die Kreuzreaktivität bzw. die gleichen Bindungsstellen von hLH und hCG am Rezeptor wurden von anderen Untersuchern schon hervorgehoben (10, 24, 29, 38). Der Einfluß von hFSH und hLH auf dieses hCG-Assaysystem wurde ausgetestet (Abbildung 8). Der Verlaufsvergleich der Standardkurven in Puffer und Serum (hLH- und hFSH-frei) zeigt eine kompetitive Bindungshemmung von hLH und eine zur Abszisse fast parallel laufende hFSH-Kurve.

Zehnfach höhere Konzentrationen von hLH sind zum Erlangen der prozentual gleichen Verdrängung des Jod¹²⁵-hCG vom Rezeptor notwendig als vom nativen hCG. hFSH kreuzreagiert nicht.

6.3.3 Serumeinfluß

Auf Grund des festgestellten Arbeitsbereiches des Assaysystems war es notwendig, Serumproben mit zu erwartenden hohen hCG-Konzentrationen zu verdünnen. Hierbei sollten die hCG-Werte pro Milliliter Serum in den verschiedenen Verdünnungen der gleichen Probe reproduzierbar sein. In Puffer/~~verdünntes~~ Serum zeigte jedoch konstant höhere hCG-Konzentrationen als das Originalserum. Zur Umgehung dieser sogenannten "unspezifischen Serumeffekte" und zum Nachweis der Abhängigkeit des Assays von hCG-Serumkonzentration wurde hLH- und hFSH-freies Serum eines hypophysektomierten Patienten angewandt. Jeder Standard erhielt 100 µl dieses Serums und die zu untersuchenden Serumproben wurden in diesem hLH- und hFSH-freien Serum reihenverdünnt. Den parallelen Verlauf von Standardkurve und hCG-Serumverdünnungen zeigt Abbildung 9.

Da hLH- und hFSH-freies Serum nicht immer zur Verfügung stand, der unspezifische Serumeffekt aber eine Standardisierung in Serum erfordert, wurde in den Standards und zum Verdünnen der Proben auch Serum von Frauen in der frühen Follikelphase verwandt. Es enthielt 30 mIU hLH pro Milliliter Serum. Abbildung 10 stellt den Einfluß dieses basalen hLH-Spiegels auf den Verlauf der hCG-Standardkurve dar. Ihre Steigung ist geringer als die der hCG-Standardkurve aus Abbildung 8 (linke Bildhälfte). Die gebundene Radioaktivität bei Inhibition durch den

niedrigsten Standard (8,2 mIU) beträgt 78 % der Bindungskapazität, das sind 10 % weniger als der kleinste Standard in hLH- und hFSH-freiem Serum verdrängt.

6.4 Anwendung des Radiorezeptorassays

Die Ausführung des Assays erfolgte nach dem oben angeführten Pipettierschema (Abb. 2). Wie aus den Rezeptorvolumenangaben hervorgeht wurden 1 ml 1/30 Rezeptorlösung sowie 200 μ l 1/10 Rezeptorlösung eingesetzt. Aus Abbildung 11 ist ersichtlich, daß das Assaysystem mit 200 μ l 1/10 Rezeptorverdünnung eine höhere Empfindlichkeit aufweist, da dessen Arbeitsbereich nach links zu geringeren hCG-Standardkonzentrationen verschoben ist. Für das höher empfindliche System errechnete sich eine Sensitivität von 30 ± 10 mIU/ml Serum bzw. $2,1 \pm 0,7$ ng/ml Serum. Diesen Assay verwandte ich für Untersuchungen in der zweiten Zyklushälfte, in der Frühschwangerschaft und bei Verdacht auf eine nicht intakte bzw. ektopische Gravidität. Fortgeschrittene Graviditäten, Chorionepitheliome und ^{andere} hCG-produzierende Tumoren wurden mit dem weniger empfindlichen System untersucht, dessen untere Nachweisgrenze für hCG im allgemeinen bei 100 ± 20 mIU/ml Serum bzw. $7,1 \pm 1,4$ ng/ml Serum lag.

Die unspezifische Bindung in Anwesenheit eines 1000-fachen Überangebotes nicht markierten Hormons bestimmt, betrug je nach spezifischer Aktivität und Gebrauchsdatum des Tracer-Hormons für 200 μ l 1/10 Rezeptorlösung 2-5 %, für 1 ml 1/30 Rezeptorlösung 10 ± 5 %, bezogen auf die Bindungskapazität. Durch Mehrfachbestimmung einer Serumprobe mit bekannter hCG-Konzentration errechnete sich ein Intraassay-Variationskoeffizient von 10 % und ein Interassayvariationskoeffizient von 16 %.

Die hCG-Serumkonzentrationen einer normalen Schwangerschaft vom ersten Zyklustag bis zur Entbindung mit dem RRA und vergleichsweise einem RIA gemessen, ergaben gleichartige

Kurvenverläufe (Abbildung 12). Der hCG-Serumkonzentrationsverlauf einer weiteren Schwangerschaft wurde von der siebenten bis zur vierzigsten Schwangerschaftswoche verfolgt (Abbildung 13). Die Werte des RRA lagen im allgemeinen um den Faktor 1,1 bis 3,1 höher. Kreuzreagierendes hLH erfaßte der Rezeptor hierbei wegen seiner Nichtdifferenzierungsfähigkeit zwischen hCG und hLH mit (45). Aus der Abbildung 12 wird deutlich, daß der Nachweis des für die Ovulation typischen hLH-Peaks auch mittels des RRA-hCG gelingt. Nach Abnahme der hLH-Werte am 16. Zyklustag steigen die im RRA-hCG gemessenen Werte zwischen dem 23. und 25. Zyklustag signifikant wieder an. In der 10. bis 12. Schwangerschaftswoche werden Werte bis 260 IU pro Milliliter Serum gemessen.

6.5 Klinische Untersuchungen

Eine Schwangerschaftsinduktion nach Ovulationsauslösung mit insgesamt 20.000 IU hCG nach vorhergehender hMG-Behandlung über 10 Tage ist in Abbildung 14 dargestellt. Das iatrogen zugeführte hCG und seine biologische Wirkungsdauer von 5 Tagen findet sich im ersten Peak wieder. Die erneute Zunahme der hCG-Werte beginnt nach dem 24. Behandlungstag. Zum Vergleich sind die Basaltemperaturkurve, die Östrogen- und Progesteronwerte dargestellt.

Abbildung 15 zeigt eine ähnliche Schwangerschaftsinduktion bei einer anderen Patientin aus der Kinderwunschsprechstunde. Auch hier ist die 5-tägige Wirkungsdauer des injizierten hCG-Präparates zu sehen, ein erneuter hCG-Werteanstieg erfolgt eindeutig erst am 30. Behandlungstag.

Die Verlaufsbeobachtung der hCG-Serumkonzentrationen einer durch Echolot bestätigten normotopen Gravidität bei einer Patientin mit Neigung zum habituellen Abort zeigt Abbildung 16. Nach Erreichen eines Maximalwertes

(88 IU/ml) am 45. Tag post conceptionem sinkt die hCG-Konzentration innerhalb von 3 Tagen auf 46 IU/ml Serum und es kommt zum Abort.

27 Patientinnen mit der Verdachtsdiagnose Extrauteringravidität (EUG, 23 bis 77 Tage nach der letzten Menstruation) wurden auf hCG-Serumkonzentrationen mittels des höher empfindlichen Assaysystems untersucht. Parallel hierzu wurde bei der Erstuntersuchung entweder ein Pregnosticon-Test oder Gonavislide-Test durchgeführt.

In 8 Fällen war das Ergebnis des RRA und der immunologischen Tests positiv. Hiervon wurden 6 Extrauteringraviditäten durch Operation bestätigt, bei den übrigen 2 Fällen handelte es sich um intakte intrauterine Graviditäten.

In 7 Fällen wurde der Verdacht auf EUG nicht bestätigt. Alle hCG-Teste fielen negativ aus und der klinische Verlauf stimmte mit diesen Ergebnissen überein.

In 12 Fällen jedoch fiel der RRA positiv aus bei negativem Ergebnis der immunologischen Schwangerschaftsteste. Bei 7 dieser 12 Patientinnen hat es sich tatsächlich um Extrauteringraviditäten gehandelt, die durch Laparoskopie und Histologie bestätigt wurden. In den anderen 5 Fällen lauteten die Diagnosen: Abortus completus (2 x), abortus incompletus (1 x), Frühgravidität (2 x).

In Tabelle 1 sind weitere Testergebnisse von Patienten aufgeführt, deren Einweisungsdiagnose und Symptomatik eine Untersuchung auf eventuell vorhandene hCG-Serumkonzentrationen angezeigt erscheinen ließ. Hierin sind auch die Chorionepitheliome und anderen hCG-produzierenden Tumoren enthalten, deren Therapie mittels hCG-RRA kontrolliert wurde.

TABELLE 1

ENTLASSUNGSBEFUND	RRA	PREGNOSTICON GONAVISLIDE
Chorionepitheliom inaktiv	-	-
Chorionepitheliom aktiv	++	-
Chorionepitheliom des Hodens	+	—
Hodentumor	+	—
Hodenteratom	-	—
Abort	+	-
Frühabort	+	-
Frühabort 13. Tag post concept.	+	-
Frühabort 13. Tag post concept.	+	-
Frühabort 35. Tag nach letzter Periode	+	-
3 Tage nach abort. incomplet. Endometriose	-	-
6 Tage nach Blasen- Molen-OP.	-	-
Zustand nach Inter- ruptio, Pазentorest	+	-
Abortivei, Plazenta- reste	+	-
Intakte Frühgravidität	+	-
Frühgravidität	+	-
Gravidität 5/6 SSW	+	? +
Opiat-Obstipation	-	-
keine Gravidität	-	-
keine Gravidität	-	-

7.0 Diskussion

Der Tropismus der Glykoproteinhormone hLH und hCG zu Ratten-testes wurde durch Autoradiographien, Immunhistologie und Bindungsstudien eingehend belegt (8, 9, 10, 17, 30, 31, 38). Die hohe Affinität von hLH/hCG zu Plasmamembranen und Bildung eines Hormon-Rezeptor-Komplexes durch spezifische Bindung von hLH und hCG, sowie die einfache Herstellung eines Testeshomogenates, ergaben die Möglichkeit einen Radiorezeptorassay zum Nachweis des Schwangerschaftshormons aufzubauen, dessen Anwendung in die klinische Routinediagnostik Eingang fand (13, 30, 31).

Mit dem nach Leidenberger et al. hergestellten Homogenat entwickelte ich zwei Assaysysteme (Abbildung 11). Sie wurden durch Austitern gewonnen, wobei die Rezeptorenverdünnung mit einer genügend hohen Bindungskapazität (Abbildung 5, links) und maximalen Verdrängung durch den niedrigsten Standard für den Assay ausgewählt wurde. Der Unterschied zwischen hoch- und niedrigempfindlich wurde gemacht, weil bei Frühgraviditäten die untere Nachweisgrenze für hCG nahe der basalen, physiologischen hLH-Sekretion (30 mIU/ml) liegen mußte. Schwangerschaften jenseits der 6. Woche weisen sehr hohe hCG-Serumkonzentrationen auf, so daß eine entsprechend hohe Verdünnung über den Umrechnungsfaktor auf 1 ml Originalserum eine größere Ungenauigkeit der tatsächlich vorhandenen hCG-Konzentration ausmacht. Daher gelangte hier der weniger empfindliche Assay zur Anwendung.

Durch die Modifikation der Jodinationstechnik - es wurde ein Verhältnis von Hormon zu Chloramin-T von 1:2 gewählt - blieb das Bindungsverhalten des markierten Hormons erhalten, wie die Inhibitionskurven in den verschiedenen Medien zeigen (23) (Abbildung 7, 8, 9, 10). Die biologische Potenz des hCG's von Dr. van Hell wurde auf Grund der

Parallelität der Standardkurven und des sich daraus errechnenden Konversionsfaktors von 1 ng van Hell-hCG zu 14 mIU des 2. IRP-hCG bestätigt (Abbildung 7). Die biologische in vivo Aktivität des Tracer-Hormons müßte durch einen biologischen Test, z.B. Gewichtszunahme der Prostata nach Jod¹²⁵-hCG-Applikation bestimmt werden (34). Dies ist von mir nicht durchgeführt worden, da in unserem Labor die Möglichkeit der Versuchstierhaltung nicht gegeben war. Ausreichend hohe Bindungskapazität (b_0 15 - 20 %) und Bindungsinhibition durch den niedrigsten Standard, sowie die Erhaltung von signifikanten Impulsdifferenzen zwischen den einzelnen Standardansätzen bestimmten die Wahl der einzusetzenden Totalaktivitäten in den beiden Assaysystemen.

Die Ursache des unspezifischen Serumeffektes ist ein noch ungelöstes Problem. Leidenberger et al beschrieben eine 8 % Äthanolbehandlung des Serums, mit der sie den unspezifischen, bindungshemmenden Effekt unterdrücken konnten. Dieser Serumeffekt soll ein unbekannter Serumfaktor sein, der nicht mit dem von ihnen gemessenen hLH identisch ist (32). Es ist zu beobachten, daß die Bindungsrate, d.h. die Bildung des Hormon-Rezeptor-Komplexes, durch einen unbekannten Serumeinfluß teilweise unterdrückt wird. Werden hCG-Serumproben original mit 100 μ l eingesetzt und erhalten auch Standards 100 μ l hLH- und hFSH-freies Serum, so sind die gemessenen hCG-Werte pro ml Serum nicht identisch mit denen einer Verdünnung derselben Probe und entsprechenden Reaktionsbedingungen für die Standards. Daraus resultiert eine Nichtreproduzierbarkeit der Werte. Ein zweites Problem entstand durch das bekannterweise kreuzreagierende hLH (10, 29, 45, 49). Zur Umgehung des ersten Problems verdünnte ich hCG-Serumproben in hLH- und hFSH-freiem Serum eines hypophysektomierten Patienten.

Die Ergebnisse wurden reproduzierbar (Abbildung 9). Das Problem des hLH-Einflusses auf den nichtdifferenzierungsfähigen Rezeptor konnte durch Zugabe von gepooltem Serum nicht schwangerer Frauen in der frühen Follikelphase zu den Standards (Abbildung 10) und durch Verdünnen der Proben in diesem Serum gelöst werden. Gleichzeitig hiermit war auch der unspezifische Serumeffekt ausgeschaltet. Saxena et al eliminierten den hLH-Einfluß durch Zugabe von Serum nicht schwangerer Frauen in der Lutealphase (45). Talaš et al verwandten Serum von Frauen, die orale Kontrazeptiva einnahmen (49). Wie früher gezeigt werden konnte, nimmt die hLH-Konzentration in der Frühgravidität nicht über die prae- wie postovulatorisch messbaren basalen Konzentrationen zu (46). Somit sind Meßwerte in der 2. Zyklushälfte, die oberhalb dieser hLH-Konzentrationen liegen, durch hCG bedingt (Abbildung 12: und ein Schwangerschaftsnachweis ist 8 bis 10 Tage post conceptionem möglich, allerdings nur wenn der Zeitpunkt des hLH-Peaks sicher bekannt ist und physiologische Schwankungsbreiten der basalen hLH-Sekretion bei verschiedenen Patienten einkalkuliert werden. Die Spezifität des entwickelten Assaysystems bestätigte sich durch die alleinige Abhängigkeit der Meßwerte von hCG-Serumkonzentrationen, wenn die oben genannten Bedingungen für die Standards und Serumproben eingehalten werden.

Abbildung 12, 13 zeigt, daß die RRA-Werte im allgemeinen über den RIA-Werten liegen. Der Quotient RRA/RIA betrug zwischen 1,1 und 3,1. Andere Untersucher fanden einen Quotienten von 2 (29). Das weist daraufhin, daß die biologische Aktivität eines Hormons nicht mit seiner immunologischen Aktivität gleichzusetzen ist. Für die biologische Aktivität bleibt festzustellen, daß bei der RRA-Methode der erhaltene Meßwert allein das Verhältnis desjenigen bindungsfähigen Hormons ausdrückt, das sowohl

bei fortgeschrittenen Graviditäten, Chorionepitheliomen und anderen hCG-produzierenden Tumoren verwandt.

Mit dem hochempfindlichen und spezifischen Assay war hCG 8 bis 10 Tage post conceptionem nachweisbar.

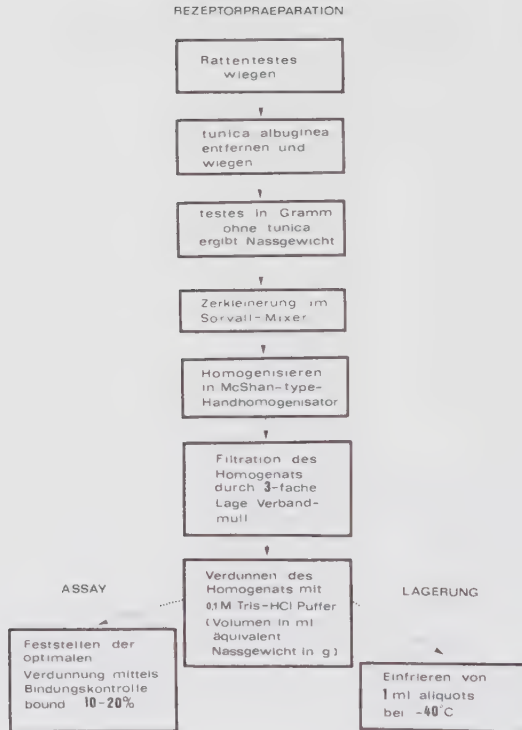


Abbildung 1

Aufarbeitung des Rezeptors

Linker Pfeil: sofortige Weiterverwendung im RRA

Rechter Pfeil: Lagerung bis zur Weiterverwendung

RRA PIPETTIERSHEMA

Bezeichnung	Puffer	Hypo-Serum	Standard	Serum-probe	Rezeptor	tracer	Volumen in ml
t_a	—	—	—	—	—	0.1	0.1
b_o	0.1	0.1	—	—	0.2 1.0	0.1	0.5 1.3
b_n	—	0.1	0.1 500 IU hCG	—	0.2 1.0	0.1	0.5 1.3
std	—	0.1	0.1	—	0.2 1.0	0.1	0.5 1.3
p	0.1	—	—	0.1	0.2 1.0	0.1	0.5 1.3

Abbildung 2

t_a = Totalaktivität der eingesetzten Tracermenge

b_o = Bindungskapazität des Rezeptors

b_n = Unspezifische Bindung des Tracers bei 1000-fachem Überangebot nicht markierten Hormons

std = Standardreihenverdünnungen

p = Serumproben

Der Rezeptor wurde entweder mit 200 μ l einer 1/10 Verdünnung für den hochempfindlichen Assay oder mit 1000 μ l einer 1/30 Verdünnung für den weniger empfindlichen Assay eingesetzt.

RIA PIPETTIERSCHEMA

Bezeichnung	Puffer	Standard	Serum- probe	tracer	Antikörper
t_a	—	—	—	100 μ l	—
b_o	200 μ l	—	—	100 μ l	100 μ l
b_n	300 μ l	—	—	100 μ l	—
std	100 μ l	100 μ l	—	100 μ l	100 μ l
p	100 μ l	—	100 μ l	100 μ l	100 μ l

Abbildung 3

Bezeichnungen wie in Abbildung 2

Standard: 2. IRP-hCG

1. Antikörper: Anti-hCG, 1:100 000

2. Antikörper: DASP

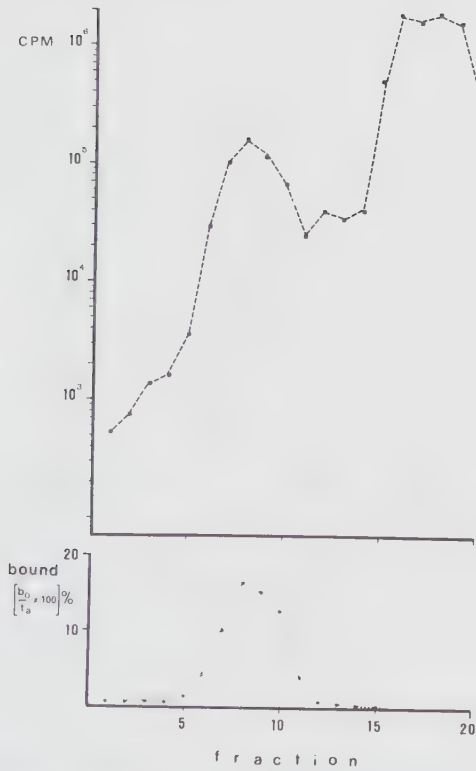


Abbildung 4

Elutionsprofil (oben): Messung der Gesamtradioaktivität von 10 μ l einer jeden Fraktion

Bindungsprofil (unten): Bindungskapazität (b_0) jeder einzelnen Fraktion.

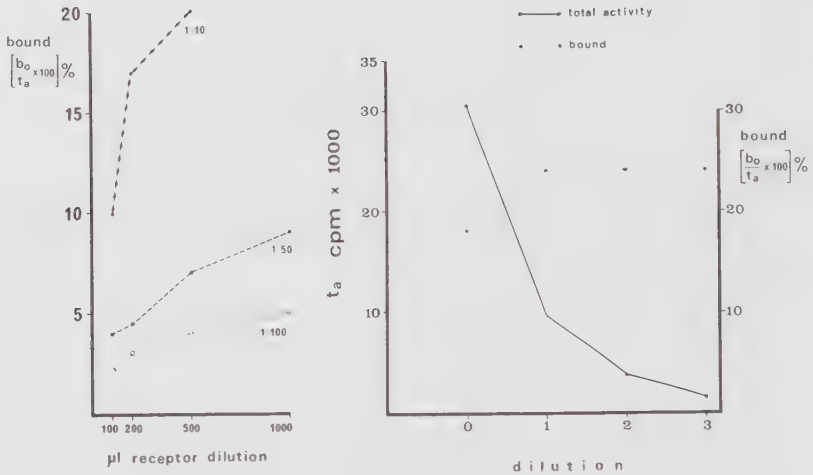


Abbildung 5

Bestimmung der optimalen Bindungskapazität
(linke Bildhälfte)

Konstante: J^{125} -hCG (27.000 cpm)

Variablen: 1) Rezeptorverdünnungen (1/10, 1/50, 1/100)
2) Einsatzvolumina

Bestimmung der einzusetzenden Totalaktivität
(rechte Bildhälfte)

Konstante: Rezeptorverdünnung (1/10, 200 μl)

Variable: Totalaktivität

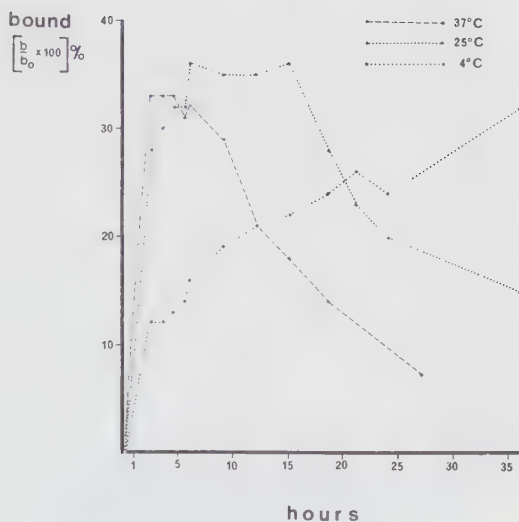


Abbildung 6

Bindungskapazität in Abhängigkeit von der Zeitdauer
der Inkubation und Inkubationstemperatur

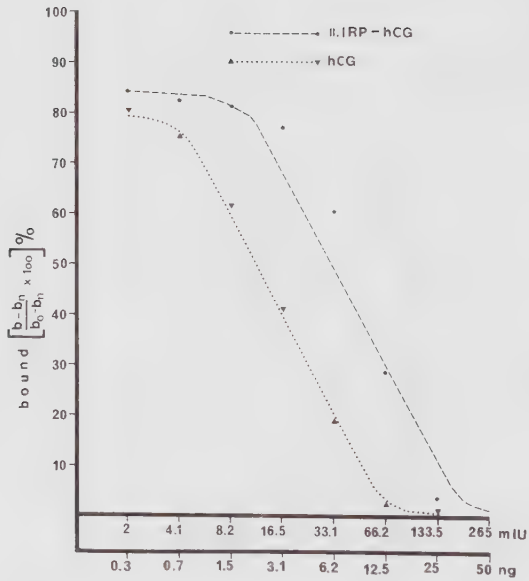


Abbildung 7

Inhibitionskurven des 2. IRP-hCG-Standards und
eines hochgereinigten hCG-Präparates (14.000 IU/mg,
Dr. van Hell, Organon, Leyden, Holland)

Die Angaben mIU bzw. ng beziehen sich auf 100 μ l.

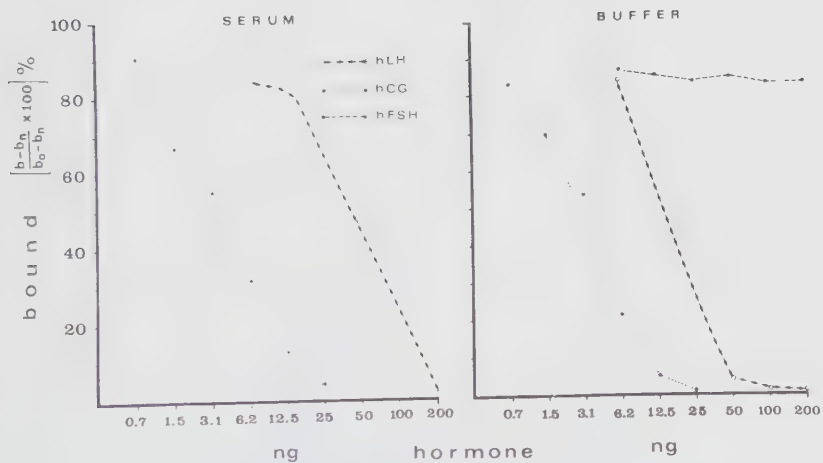


Abbildung 8

Kreuzreaktionsstudie in Serum und Puffer

hLH - LER 60

hFSH - LER 1801-3

hCG - Dr. van Hell

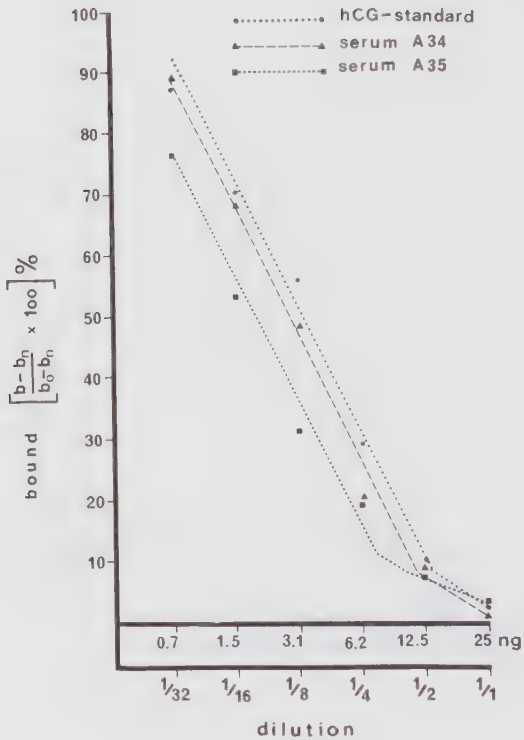


Abbildung 9

Parallelitätsstudie. Standardkurve und Serum schwangerer Frauen (A 34, A 35) in Serum eines hypophysektomierten Patienten reihenverdünnt. Die ng-Werte sind pro 100 μ l angegeben.

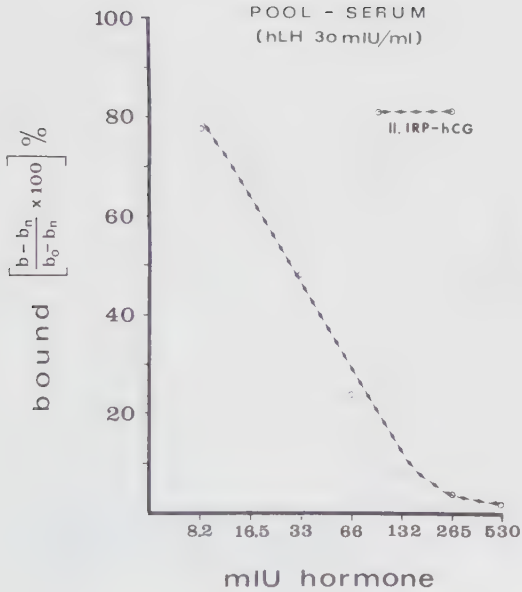


Abbildung 10

Standardkurve in gepooltem Serum von Frauen in der frühen Follikelphase. Die mIU-Werte sind pro 100 μ l angegeben.

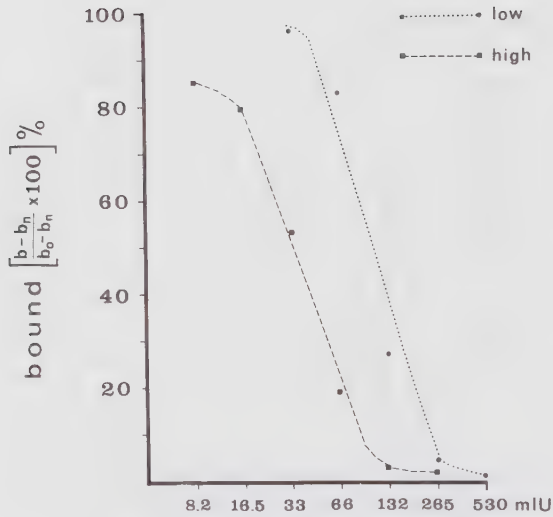


Abbildung 11

Sensitivitätsvergleich zwischen hochempfindlichem (high) und niedrigempfindlichem (low) Assaysystem mit dem 2. IRP-hCG Standard. Angabe in mIU pro 100 μ l

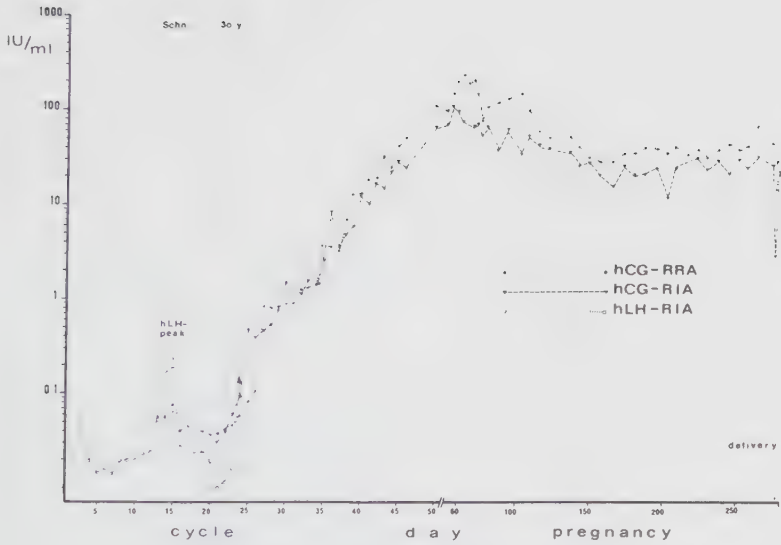


Abbildung 12

Serumkonzentrationen von hLH und hCG während des Konzeptionszyklus und der daran anschließenden Schwangerschaft bei einer Patientin. Vergleich der durch RRA und RIA gemessenen hCG-Serumspiegel.

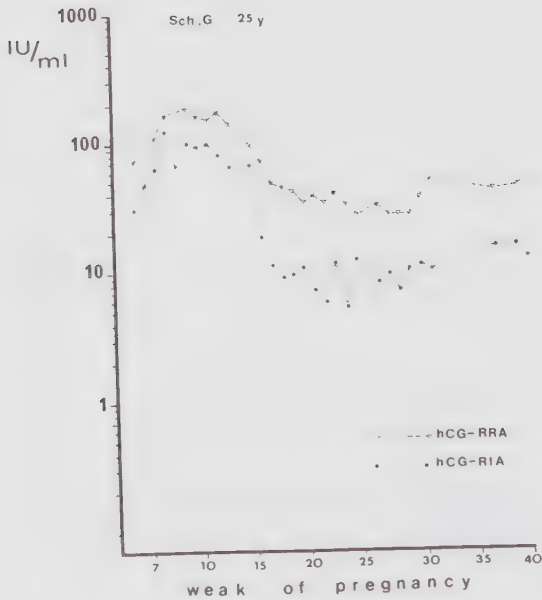


Abbildung 13

Serumkonzentrationen von hCG während der 6. bis 40. Schwangerschaftswoche bei einer Patientin. Vergleich der im RRA und RIA gemessenen hCG-Serumspiegel.

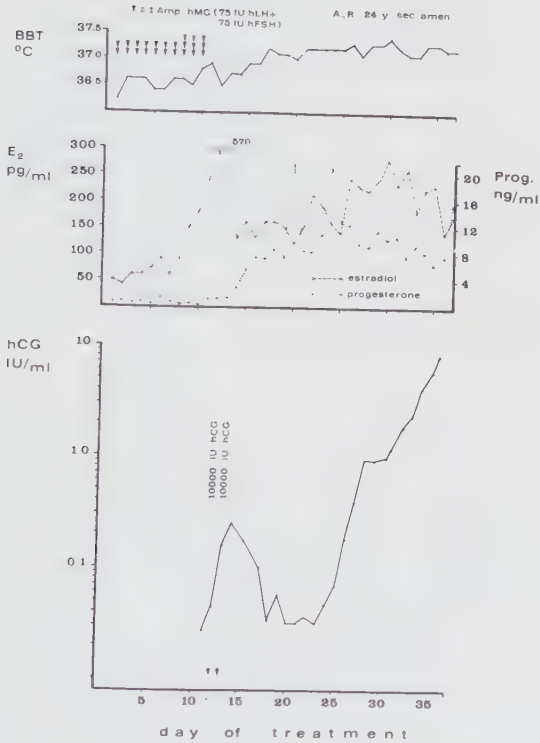


Abbildung 14

Serumkonzentrationen von Östradiol, Progesteron und hCG während exogener Stimulation mit Postmenopausengonadotropin (hMG) und hCG bei der Patientin A.R. mit hypogonadotroper Amenorrhoe. Zusätzlich ist die Basaltemperaturkurve (BBT) während des Behandlungszeitraumes dargestellt.

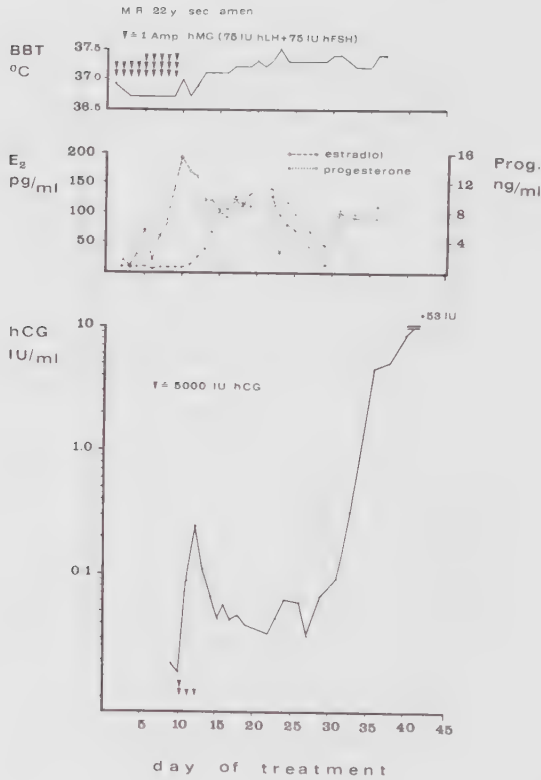


Abbildung 15

Serumkonzentrationen von Östradiol, Progesteron und hCG während exogener Stimulation mit Postmenopausengonadotropin (hMG) und hCG bei einer Patientin M.R. mit hypogonadotroper Amenorrhoe. Zusätzlich ist die Basaltemperaturkurve (BBT) während des Behandlungszeitraumes dargestellt.

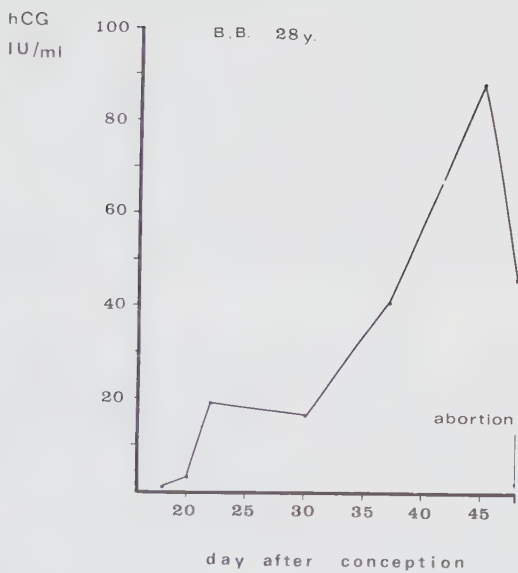


Abbildung 16

Serumkonzentrationen von hCG bei der zum
habituellen Abort neigenden Patientin B.B.

10.0 Literatur

1. Adcock, E.W., Teasdale, F., August, Ch., Cox, S., Meschia, J., Battaglia, F.C., Naughton, M.A.: Human chorionic gonadotropin: its possible role in maternal lymphocyte suppression. Science 181: 845 (1973)
2. Aschheim, S., Zondek, B.: Hypophysenvorderlappenhormon und Ovarialhormon im Harn von Schwangeren. Klin. Wschr. 6: 1322 (1927)
3. Bahl, O.P.: Human chorionic gonadotropin. I. Purification and physicochemical properties. J. biol. Chem. 244: 567 (1969)
4. Bahl, O.P.: Studies on the primary structure of hCG and its relationship to other glycoprotein hormones. In: Saxena, B.B., Beling, C.G., Gandy, H.M. (eds.) Gonadotropins, p. 200, Wiley-Interscience, New York (1972)
5. Bahl, O.P.; Carlsen, R.B., Bellisario, R., Swaminathan, N.: Human chorionic gonadotropin: amino acid sequence of the α and β subunits. Biochem. Biophys. Res. Commun. 48: 416 (1972)
6. Brody, S., Carlström, G.: Immunoassay of human chorionic gonadotropin in normal and pathologic pregnancy. J. Clin. Endocrin. Metab. 22: 564 (1962)
7. Canfield, R.E., Morgan, F.J., Kammerman, S., Bell, J.J., Agosto, G.M.: Studies of human gonadotropin. Res. Progr. Horm. Res. 27: 121 (1971)

8. Castro,A.E., Alonso,A., Mancini,R.E.: Localisation of folliclestimulating and luteinizing hormones in the rat testis using immunohistological tests. J.Endocrin. 52: 129 (1972)
9. Catt,K.J., Dufau,M.L.: Gonadotropin receptors of the rat testis and ovary. In: Crosignani,P.G., James,V.H.T. (eds) Recent progress in reproductive endocrinology, p. 83. Academic Press, Inc., London (1974)
10. Catt,K.J., Dufau,M.L.: Interactions of LH and hCG with testicular gonadotropin receptors. In: O'Malley, B.W., Means,A.R. (eds) Advances in experimental medicine and biology. Vol. 36: 379 (1973) Plenum Press, New York (1973)
11. Catt,K.J., Dufau,M.L., Tsuruhara,T.: Absence of intrinsic biological activity in LH and hCG subunits. J.Clin.Endocrin.Metab. 36: 73 (1973)
12. Catt,K.J., Dufau,M.L., Tsuruhara,T.: Studies on a radioligand-receptor assay system for luteinizing hormone and chorionic gonadotropin. J.Clin.Endocrin. 32: 860 (1971)
13. Catt,K.J., Tsuruhara,T., Dufau,M.L.: Gonadotropin binding sites of the rat testis. Biochem.Biophys. Acta 279: 194 (1972)
14. Catt,K.J., Dufau,M.L.: Methods for determination of gonadotropins in vitro: solid phase radioimmunoassay, radioligand-receptor-assay and in vitro bioassay. In: Crosignani,P.G., James,V.H.T. (eds) Recent progress in reproductive endocrinology, p. 131, Academic Press Inc., London (1974)

15. Channing, C.P., Kammerman, S.: Characteristics of gonadotropin receptors of porcine granulosa cells during follicle maturation. *Endocrinology* 92: 531 (1973)
16. Csapo, A.J., Pulkinen, M.O., Ruttner, B., Sauvage, J.P., Wiest, W.G.: The significance of the human corpus luteum in pregnancy maintenance. *Am.J.Obstet.Gyn.* 112: 1061 (1972)
17. De Kretser, D.M., Catt, K.J., Burger, H.G., Smith, G.C.: Radioautographic studies on the localisation of ¹²⁵I-labelled human luteinizing and growth hormone in immature male rats. *J.Endocrinology* 43: 105 (1969)
18. Dr.v.Hell: Persönliche Mitteilung
19. Franchimont, P., Burger, H.: Human growth hormone and gonadotropins in health and disease. pp. 211, 185. North-Holland Pub. Comp., Amsterdam, Oxford (1975)
20. Froewis, J.: Wann erfolgt die ausreichende Umschaltung der schwangerschaftserhaltenden Hormonproduktion des corpus luteum graviditatis auf die Plazenta? *Wien, Klin.Wschr.* 75: 368 (1963)
21. Gaede, P.: Qualitative Bestimmung von Choriongonadotropin (hCG) im Urin der Schwangeren. *Med. Welt* 26: 1424 (1975)
22. Geiger, W.: Radioimmunologische Bestimmungen von hCG, hCS, STH und TSH. *Fortschr. Geb. Gynäk.*, Vol. 52: 1-120 (1974), Karger, Basel (1974)

23. Greenwood, F.C., Hunter, W.M., Glover, J.S.: The preparation of ^{131}J -labelled human growth hormone of high specific radioactivity. *Biochem.J.* 89: 114 (1963)
24. Kammerman, S., Ross, J.: Increase in numbers of gonadotropin receptors on granulosa cells during follicle maturation. *J.Clin.Endocrin. Metab.* 41: 546 (1975)
25. Kirkham, K.E., Hunter, W.M. (eds). *Radioimmunoassay methods*. Yongman Group Limited, Edinburgh (1971)
26. Knoth, M., Patillo, R.A., Garancis, J.C., Gey, G.O., Ruckert, A.C.F., Mattingly, R.F.: Ultrastructure and hormone synthesis of chorioncarcinoma in vitro. *Am.J.Pathol.* 54: 479 (1969)
27. Kubin, M.: Gel permeation chromatography. In: Deyl, Z., Macek, K., Janak, J. (eds). *Journ. of Chromatography Library*, Vol. 3: 57 (1975), Elsevier Scientific Pub. Comp., Amsterdam (1975)
28. Landesman, R., Saxena, B.B.: Results of the first 1000 radioreceptorassays for the determination of human chorionic gonadotropin: a new, rapid, reliable and sensitive pregnancy test. *Fertil. Steril.* 27: 357 (1976)
29. Lee, C.Y., Ryan, R.J.: Radioreceptor assay of human chorionic gonadotropin. *J.Clin.Endocrin.Metab.* 40: 228 (1975)
30. Leidenberger, F., Reichert, L.E.jr.: Studies on the uptake of human chorionic gonadotropin and its subunits by rat testicular homogenates and interstitial tissue. *Endocrinology* 91: 135 (1972)

31. Leidenberger, F., Reichert, L.E. jr.: Evaluation of a rat testis homogenate: Radiology and receptor assay for human pituitary LH. *Endocrinology* 91: 901 (1972)
32. Leidenberger, F.A., Willaschek, R., Pahnke, V., Reichert, L.E. jr.: Application of a radioligand receptor assay for determination of luteinizing hormone in human serum. *Acta endocrin.* 81:54 (1976)
33. Loke, Y.W., Wilson, D.V., Borland, R.: Localisation of human chorionic gonadotropin in monolayer cultures of trophoblast cells by mixed agglutination. *Am.J. Obstet.Gyn.* 113: 875 (1972)
34. Loraine, J.A.: The estimation of chorionic gonadotropin in the urine of pregnant women. *J.Endocrin.* 6: 319 (1950)
35. Mainini, C.G.: Pregnancy test using the male toad. *J.Clin.Endocrin.* 7: 653 (1947)
36. Morgan, F.J., Canfield, R.E.: Nature of the subunits of human chorionic gonadotropin. *Endocrinology* 88: 1045 (1971)
37. Morgan, F.J., Birken, S., Canfield, R.E.: Comparison of the chorionic gonadotropin and luteinizing hormone. *FEBS letters* 31: 4 (1973)
38. Pahnke, V.G., Leidenberger, F.A., Künzig, H.J.: Correlation between hCG (LH)-binding capacity, Leydig Cell number and secretory activity of rat testis throughout pubescence. *Acta endocrin.* 79: 610 (1975)

39. Prasad, M.R.N.: Gonadotropic control of the development of testis and accessory organs. In: Moudgal V.R. (ed.) Gonadotropins and gonadal function. p. 199, Academic Press Inc., New York (1974)
40. Rao, Ch.V., Saxena, B.B.: Gonadotropin receptors in the plasma membrane of rat luteal cells. Biochem. Biophys. Acta 313: 372 (1973)
41. Reichert, L.E., Lawson, G.M., Leidenberger, F.A., Trowbridge, C.G.: Influence of α - and β -subunits on the kinetics of formation and activity of native and hybrid molecules of LH and human chorionic gonadotropin. Endocrinology 93: 938 (1973)
42. Reichert, L.E. jr., Leidenberger, F.A., Trowbridge, C.G.: Studies on luteinizing hormone and its subunits: development and application of a radioligand receptor assay and properties of the hormone receptor interaction. Res. Progr. Horm. Res. 29: 497 (1973)
43. Ross, G.T., Vaitukaitis, J.L., Robbins, J.B.: Preparations and properties of antisera made to α - and β -subunits of human chorionic gonadotropin. In: Margoulis and Greenwood: Protein and polypeptide hormones. Excerpta Med. Int. Congr. Ser. No. 241 (1971)
44. Ross, G.T., Cargille, C.M., Lipsett, M.B., Rayford, P.L., Marshall, J.R., Strott, C.A., Rodbard, D.: Pituitary and gonadal hormones in women during spontaneous and induced ovulatory cycles. Res. Progr. Horm. Res.: 26: 1 (1970)
45. Saxena, B.B., Landesman, R.: The use of a radioreceptor-assay of human chorionic gonadotropin for the diagnosis and management of ectopic pregnancy. Fertil. Steril. 26: 397 (1975)

46. Saxena, B.B., Schmidt-Gollwitzer, K.: Determination of protein hormones by radioimmuno- and radioreceptor assays in human plasma with emphasis during normal pregnancy. In: Hormonal investigations in human pregnancy. Edited by R. Scholler, Paris, Editions SEPE (1974)
47. Schmidt-Gollwitzer, K., Saxena, B.B., Schmidt-Gollwitzer, M.: Radioimmunological determination of FSH, LH and hCG with antibodies for β -subunits. Acta endocrin. (Kbh) Suppl. 184: 192 (1974)
48. Swaminathan, N., Bahl, O.P.: Studies on the separation and recombination and on the primary structure of the subunits of human chorionic gonadotropin. Fed. Proc. 29: 599 (1970)
49. Talaš, M., Midgley, A.R., jr.: Diagnostic use of a radioreceptor assay for human chorionic gonadotropin. In: Radioimmunoassay and related procedures in medicine. Vol. 1: 267. Printed by the IAEA, Austria (1974)
50. Tsuruhara, T., Dufau, M.L., Hickman, J., Catt, K.J.: Biological properties of hCG after removal of terminal sialic acid and galactose residues. Endocrinology 91: 296 (1972)
51. Villee, C.A., Gabbe, St.G.: Effects of gonadotropins on placental steroidogenesis. In: Saxena, B.B., Beling, C.G., Gandy, H.M. (eds) Gonadotropins p. 309 Wiley-Interscience, New York (1972)

52. Wardlaw, S., Lauersen, N.H., Saxena, B.B.: The LH-hCG receptor of human ovary at various stages of the menstrual cycle. *Acta endocrin.* 79: 568 (1975)
53. Weber, J.: The site of production of gonadotropin in the placenta at term. *Acta obstet.gynec.scand.* 40: 139 (1961)
54. Wide, L., Gemzell, C.A.: An immunological pregnancy test. *Acta endocrin.Copenh.* 35: 261 (1960)
55. Williams, R.H. (ed): Textbook of endocrinology. 5th edition, p. 395. W.B. Saunders Company, Philadelphia (1974)
56. Yalow, R.S., Berson, S.A.: Immunoassay of endogenous plasma insulin in man. *J.Clin.Invest.* 39: 1157 (1960)

11.0

Danksagung

Herrn Professor Dr. J. Nevinny-Stickel danke ich für die Überlassung des Themas und das freundliche Entgegenkommen bei allen sich stellenden Fragen.

Herrn Dr. M. Schmidt-Gollwitzer gilt mein Dank für die Anleitung zum wissenschaftlichen Arbeiten.

Der Firma Schering AG, insbesondere Herrn Prof. Dr. Neumann, Abteilung für Endokrinpharmakologie, danke ich für die freundliche Überlassung der für diese Arbeit notwendigen Rattentestes.

Den chemotechnischen Assistentinnen, Frau Schmidt, Frau Mosch, danke ich für die Beratung in labor-technischen Fragen.

12.0

L e b e n s l a u f

Geboren am 27. 12. 1946 in Nürnberg als Sohn
des Dipl.-Kfm. Helmut Koch und dessen Ehefrau
Auguste Koch.

Einschulung:	Ostern 1953 in Marl, NRW
Umschulung:	1957, Albert-Schweitzer-Gymnasium
Reifezeugnis:	4. 11. 1966
Bundeswehrdienst:	1. 1. 1967 - 30. 6. 1968
Studienbeginn:	Wintersemester 1968 an der Freien Universität Berlin in der medizinischen Fakultät
Naturwissenschaft- liche Vorprüfung:	Sommersemester 1969
Medizinische Vorprüfung:	Sommersemester 1971
Staatsexamen:	15. September 1975 an der Freien Universität Berlin
Beginn der Doktorarbeit:	15. 10. 1975
Förderung nach dem GFG:	seit 1. 4. 1976

A n h a n g

1) Rezeptorenausbeute

1 g Hodengewicht plus 1 ml Puffer führten zu einem Puffer-Rezeptorngemisch von 1,5 ml einer 1:2 Verdünnung. Die im BRA eingesetzte Verdünnungsstufe von 1:10 bzw. 1:30 wurde durch Verfünf- bzw. Verfünffzehnfachung des Ausgangsvolumens erreicht. Bei einem Einsatzvolumen von 200 µl bzw. 1 ml sind 25 bzw. 20 Inkubationsröhrchen mit Rezeptorlösung beschickbar.

2) Die angegebenen Zahlenwerte zur spezifischen Traceraktivität sind Mittelwertangaben aus 20 Markierungen.

3) Die Exaktheit der Methode wurde an Hand des Kriteriums der Reproduzierbarkeit bekannter Werte überprüft. Die Genauigkeit wurde durch 20fache Bestimmung der gleichen Serumprobe getestet (Intraassayvariationskoeffizient 10%, Interassayvariationskoeffizient 16%). Die Spezifität der hCG-Messung wurde durch Ausschaltung des "unspezifischen Serumfaktors" erhöht. Die Empfindlichkeit bestimmte sich durch den niedrigsten Standard, der noch zu einer meßbaren Countdifferenz in der ansteigenden Standardkurve führte.

4) Nachträglich getestete Rattenhodenhomogenate, die 8 Monate bei -40°C gelagert hatten, zeigten einen 10%igen Bindungsverlust gegenüber frischen Homogenaten. Die Assaykriterien wie Reproduzierbarkeit und Sensitivität, veränderten sich nicht.

